

Влияние экзогенного мелатонина на ультраструктуру гепатоцитов крыс при экспериментальном токсическом повреждении

С.А. Грабеклис¹, Л.М. Михалева¹, А.М. Дыгай², М.А. Козлова¹, В.П. Черников¹, Д.А. Арешидзе¹

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына, Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Постоянное освещение в течение длительного времени подавляет синтез мелатонина шишковидной железой и вызывает десинхроноз, повышающий риск развития различных патологий, включая нарушения функций печени. Известно, что экзогенный мелатонин обладает выраженным гепатопротекторным действием, однако его роль в защите печени от токсического действия тетрахлорметана (CCl₄) недостаточно изучена. Кроме того, остаются неясными значение нарушений циркадной ритмичности на фоне дефицита мелатонина в развитии патологий печени, а также механизмы гепатопротекторного действия экзогенного мелатонина при токсическом повреждении.

Цель — изучить влияние темновой депривации и экзогенного мелатонина на ультраструктуру митохондрий в гепатоцитах крыс при токсическом повреждении тетрахлорметаном.

Методы. Исследование проведено на самцах крыс линии Вистар ($n=200$) в возрасте 6 месяцев, массой (350 ± 15) г. Животных распределили на 5 групп: I — контрольная группа, крыс содержали при фиксированном световом режиме; II — крыс содержали в условиях темновой депривации; III — животных содержали при фиксированном световом режиме, один раз в 3 дня внутрибрюшинно вводили CCl₄ (в смеси с оливковым маслом, в дозе 0,3 мг/кг); IV — крыс содержали в условиях темновой депривации, один раз в три дня вводили CCl₄; V — животных содержали в условиях темновой депривации, один раз в три дня вводили CCl₄ (внутрибрюшинно) и ежедневно — мелатонин (Sigma-Aldrich, США; внутривенно, в дозе 0,3 мг/кг) ежедневном внутривенном введении мелатонина («Sigma-Aldrich, Inc.», США) в дозе 0,3 мг/кг.

Длительность эксперимента составила 3 недели. Оценку ультраструктуры гепатоцитов осуществляли на срезах печени методом трансмиссионной электронной микроскопии. Микроморфометрический анализ митохондрий включал измерение площади органелл, определение количества и длины крист, расчёт концентрации внутренних мембран митохондрий (KBMM). Статистическую обработку результатов выполняли в программе GraphPad Prism v8.41 (GraphPad Software, США).

Результаты. При темновой депривации в гепатоцитах крыс наблюдали существенные структурные изменения: отёк цитоплазмы, деформацию ядер, «осыпание» рибосом с поверхности эндоплазматического ретикулума, снижение количества митохондрий, уменьшение длины крист и KBMM. Воздействие CCl₄ вызывает более тяжёлые повреждения гепатоцитов, включая вакуолизацию цитоплазмы, набухание митохондрий и некроз. На фоне темновой депривации токсический эффект CCl₄ усугубляется — уменьшается общее количество митохондрий при компенсаторном увеличении их площади, происходит укорочение крист и снижение KBMM, что свидетельствует о снижении функциональной активности органелл. Введение мелатонина оказывает протекторное действие на гепатоциты, проявляющееся в сохранении формы ядер, меньшем количестве липидных вакуолей и нормализации микроморфометрических показателей митохондрий.

Заключение. Дефицит эпифизарного мелатонина в условиях темновой депривации усугубляет гепатотоксическое действие CCl₄, что связано с индукцией окислительного стресса и развитием митохондриальной дисфункции. Установлено, что мелатонин обладает выраженным гепатопротекторным действием, способствуя стабилизации ультраструктуры гепатоцитов и поддержанию их энергетического метаболизма. Полученные данные свидетельствуют в пользу применения мелатонина для защиты печени при хронических интоксикациях и нарушениях циркадной ритмичности.

Ключевые слова: CCl₄; тетрахлорметан; гепатоциты; митохондрии; мелатонин; гепатопротекторное действие.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Грабеклис С.А., Михалева Л.М., Дыгай А.М., Козлова М.А., Черников В.П., Арешидзе Д.А.
Влияние экзогенного мелатонина на ультраструктуру гепатоцитов крыс при экспериментальном
токсическом повреждении // Морфология. 2025. Т. 163, № 3. С. XX–XX.
DOI: 10.17816/morph.678840 EDN: RJXVBL

© Эко-Вектор, 2025

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International

Рукопись получена: 25.04.2025

Рукопись одобрена: 26.05.2025

Опубликована online: 23.06.2025

Effect of exogenous melatonin on the ultrastructure of rat hepatocytes in experimental toxic damage

Sevil A. Grabeklis¹, Lyudmila M. Mikhaleva¹, Alexandr M. Dygai², Maria A. Kozlova¹, Valery P. Chernikov¹, David A. Areshidze¹

¹Petrovsky National Research Centre of Research Institute of Human Morphology named after Academician A.P. Avtsyn

Russian Scientific Center for Surgery named after Academician B.V. Petrovsky, Moscow, Russia;

²Institute Of General Pathology And Pathophysiology, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Prolonged exposure to constant light suppresses melatonin synthesis by the pineal gland and causes desynchronosis, which can cause a number of liver function disorders and lead to the development of various pathologies. Exogenous melatonin demonstrates a pronounced hepatoprotective effect, but the role of epiphyseal hormone in protecting the liver from the toxic effects of CCl₄, the role of circadian rhythm disturbances in the development of liver damage in conditions of melatonin deficiency, as well as the hepatoprotective effect of exogenous melatonin in conditions of toxic liver damage remains unclear.

AIM: To study the effect of dark deprivation and exogenous melatonin on the ultrastructure of hepatocytes in toxic carbon tetrachloride (CCL₄) damage.

METHODS: The study was conducted on male Wistar rats (n=200) at the age of 6 months, weighing 350±15 g. The animals were divided into 5 groups: a control group kept under a fixed light regime; a group in conditions of dark deprivation; a group in a fixed light regime, in which the animals received CCl₄ (0.3 mg/kg in a mixture with olive oil) via the intraperitoneal route twice a week; a group in dark deprivation with a similar injection of CCl₄ and a group in dark deprivation with exposure to CCl₄ and daily intragastric administration of melatonin (Sigma-Aldrich, Inc., USA) at a dose of 0.3 mg/kg. The duration of the experiment was 21 days, after which liver evisceration was performed. The ultrastructure of hepatocytes was assessed by transmission electron microscopy (TEM), and micromorphometric analysis of mitochondria (area, number, and length of crysts, concentration of mitochondrial inner membranes) was performed. Statistical processing of the results was performed in the GraphPad Prism v8.41 program (USA).

RESULTS: Dark deprivation causes swelling of the cytoplasm of hepatocytes, deformation of nuclei, shedding of ribosomes with EPR, a decrease in the number of mitochondria, the length of crysts and the concentration of the inner membranes of mitochondria. Exposure to CCL₄ leads to more severe damage, including vacuolization, mitochondrial swelling, and hepatocyte necrosis. In combination with dark deprivation, the toxic effect of CCL₄ is aggravated – there is a compensatory increase in the area of mitochondria with a decrease in their total number and a decrease in the length of crysts and concentration of mitochondrial inner membranes, which indicates a decrease in their functionality. The using of melatonin had a protective effect, manifested in the restoration of the shape of the nuclei, reduction of lipid vacuoles and normalization of micromorphometric parameters of hepatocytes.

CONCLUSION: Epiphyseal melatonin deficiency in dark deprivation exacerbates CCL₄ hepatotoxicity due to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. It has been established that melatonin has a pronounced hepatoprotective effect, stabilizing the ultrastructure of hepatocytes and their energy metabolism. The use of melatonin to protect the liver in chronic intoxication and circadian disorders is promising.

Keywords: CCL₄; hepatocytes; micromorphometry; melatonin; hepatoprotective effect.

TO CITE THIS ARTICLE:

Grabeklis SA, Mikhaleva LM, Dygai AM, Kozlova MA, Chernikov VP, Areshidze DA. Effect of exogenous melatonin on the ultrastructure of rat hepatocytes in experimental toxic damage. *Morphology*. 2025;163(3):XX-XX. DOI: 10.17816/morph.678840 EDN: RJXVBL

© Eco-Vector, 2025

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License

Received: 25.04.2025

Accepted: 26.05.2025

Published online: 26.03.2025

ОБОСНОВАНИЕ

Воздействие света в ночное время, чаще всего имеющее антропогенную природу, является одним из ведущих факторов, вызывающих нарушения нормальной суточной ритмичности функционирования печени [1, 2].

Развитие десинхроноза предшествует более серьёзным морфофункциональным изменениям в органах. Удлинение световой части суток подавляет синтез мелатонина в шишковидной железе, что приводит к нарушению циркадных ритмов его выработки [3] и, как следствие, к существенным морфофункциональным изменениям в печени [4, 5].

Для изучения механизмов токсического повреждения печени и процессов её восстановления у лабораторных животных используется тетрахлорметан (CCl_4) [6]. Под гепатотоксическим действием подразумевают негативные изменения гомеостаза гепатоцитов с выраженными морфологическими и функциональными проявлениями [7, 8].

Действие CCl_4 на печень связано с образованием токсичных продуктов — свободных радикалов, активирующих перекисное окисление [9, 10], и протекает в несколько хорошо изученных этапов: восстановительное дегалогенирование, ковалентное связывание радикалов, ингибирование синтеза белков, накопление жиров, потеря гомеостаза кальция, апоптоз и фиброз [11–13]. В совокупности эти процессы вызывают развитие стойких структурных и функциональных нарушений печени.

Мелатонин является мощным антиоксидантом [14–16], обладающим гепатопротекторным эффектом. Установлено, что применение мелатонина в экспериментальных моделях, особенно на ранних этапах развития неалкогольной болезни печени, нормализует липидный обмен, ослабляет стеатоз и снижает уровень аминотрансфераз [17–19]. Мелатонин предотвращает развитие стресса эндоплазматической сети, который часто наблюдается в гепатоцитах при стеатозе (жировом гепатозе), а также при токсическом воздействии CCl_4 [20, 21]. Кроме того, описано гепатопротекторное действие мелатонина при экспериментальном циррозе [22, 23] и опухолях печени [24, 25]. Применение экзогенного мелатонина в значительной мере нивелирует фиброгенное действие CCl_4 . Такое действие связано с увеличением синтеза глутатиона за счёт усиления активности глутамилцистеинсинтазы, а также со стимуляцией выработки супероксиддисмутазы [26–30].

Однако необходимо заметить, что данные, представленные в литературе, носят неоднозначный характер, а некоторые исследователи приводят противоположные результаты [31].

Таким образом, несмотря на доказанность гепатопротекторного действия мелатонина при некоторых видах патологии, остаётся неясным его участие в защите печени от токсического воздействия CCl_4 , а также значение нарушений циркадной ритмичности на фоне дефицита мелатонина в развитии повреждений печени. Механизмы гепатопротекторного действия мелатонина в условиях токсического повреждения печени также до конца не выяснены.

Цель — изучить влияние темновой депривации и экзогенного мелатонина на ультраструктуру митохондрий в гепатоцитах крыс при токсическом повреждении тетрахлорметаном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ**

Проведено экспериментальное проспективное контролируемое выборочное одноцентровое исследование.

КРИТЕРИИ ОТБОРА

Исследование проведено на самцах крыс линии Вистар ($n=200$) в возрасте 6 месяцев, массой (350 ± 15) г. Животные были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России «Столбовая». Критерием включения в исследование являлось отсутствие видимых отклонений в поведении и внешнем виде (состоянии шерсти, глаз, конечностей).

ОПИСАНИЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА И УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ

Всех животных содержали в стандартных пластиковых клетках, при температуре 20–22°C и относительной влажности воздуха 60–70%. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ.П081.В00113, ГОСТ Р 50258-92) и первоначально содержались при естественном освещении.

Крыс случайным образом разделили на 5 групп: I — контрольная группа ($n=40$), животных содержали при фиксированном световом режиме (соотношение светлого и тёмного времени 12:12 ч, с включением света в 8:00 ч и выключением в 20:00 ч); II — крыс ($n=40$) содержали в темноте 24 ч в сутки (темновая депривация); III — животных ($n=40$) содержали при фиксированном световом режиме 12:12 ч, один раз в три дня внутрибрюшинно вводили CCl_4 (Sigma-Aldrich, США) (в смеси с оливковым маслом в дозе 0,3 мг/кг), каждому животному проведено по 7 инъекций [32]; IV — крыс ($n=40$) содержали в условиях темновой депривации, CCl_4 вводили по той же схеме; V — крыс ($n=40$) содержали в условиях темновой депривации, вводили CCl_4 (внутрибрюшинно) один раз в три дня и ежедневно — водный раствор мелатонина (Sigma-Aldrich, США; внутривенно, в дозе 0,3 мг/кг). Мелатонин вводили в вечерние часы — в промежутке с 20.00 ч до 21.00 ч, с тем, чтобы максимальная концентрация гормона в крови приходилась на ночное время.

Длительность эксперимента составила 3 недели. Эвисцерацию печени проводили после эвтаназии животных путём передозировки эфира.

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ ИСХОДОВ

Образцы печени размером 2 мм^3 фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, приготовленном на фосфатном буфере (pH 7,4), затем постфиксировали в 1% растворе оксида осмия (OsO_4) и обезживали в этаноле. В процессе обезживания образцы контрастировали 1% уранилацетатом (раствор в 70% этаноле), после чего заливали в смесь эпон–аралдит по стандартной методике [33].

Ультратонкие срезы печени, полученные на ультратоме LKB-III (LKB Produkter, Швеция), дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-100CX (JEOL, Япония). Фотофиксацию препаратов осуществляли с помощью камеры Gatan ES500W Erlangshen (Model 782; Gatan Inc., США).

Для микроморфометрической оценки митохондриального аппарата в гепатоцитах на каждом препарате анализировали по 20 непересекающихся полей зрения при увеличении 20 000 и 10 полей зрения при увеличении 50 000 [для расчёта концентрации внутренних мембран митохондрий (KBMM)]. С целью стандартизации результатов исследования на полутонких срезах, окрашенных толудиновым синим, для анализа выбирали однотипные участки — промежуточную зону печёночных долек [34].

С помощью программы QuPath (Division of Pathology at the University of Edinburgh, Великобритания) определяли следующие морфометрические параметры:

- среднюю суммарную площадь сечения митохондрий на 100 мкм^2 цитоплазмы;
- среднее количество митохондрий на 100 мкм^2 цитоплазмы;
- среднюю площадь сечения одной митохондрии;
- средний периметр одной митохондрии;
- среднюю суммарную длину крист в одной митохондрии;
- среднее количество крист в одной митохондрии;
- среднюю длину одной кристы.

KBMM рассчитывали по формуле:

$$\text{KBMM} = (p + 2L)n \quad (1)$$

где p — средний периметр митохондрии, L — средняя длина кристы в одной митохондрии, n — количество митохондрий на единицу площади гепатоцита (100 мкм^2) [35].

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Построение графиков и статистическую обработку результатов выполняли в программе GraphPad Prism v8.41 (GraphPad Software, США). Для проверки типа распределения значений в выборках использовали тест Д'Агостино–Пирсона. При нормальном распределении показателя использовали t -тест Стьюдента для парного сравнения и тест Тьюки для сравнения трёх и более групп. Различия между группами исследования и контролем оценивали с помощью теста Даннета. При распределении, отличном от нормального, использовали тест Манна–Уитни для парного сравнения и тест Данна для сравнения трёх и более групп. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости (α) или вероятности ошибки отклонения от нулевой гипотезы ниже 5% ($p < 0,05$). Для построения графиков использовали среднее арифметическое значение и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ультраструктурная организация гепатоцитов у крыс контрольной группы (рис. 1) соответствует норме. В клетках визуализируются: округлые центрально расположенные ядра, в части из которых заметны ядрышки (рис. 1, *b*); группы митохондрий с электронно-плотным матриксом; хорошо развитые гладкая (рис. 1, *a*) и шероховатая (рис. 1, *a, b*) эндоплазматическая сеть; комплекс Гольджи; значительное количество зёрен гликогена. У крыс контрольной группы, содержащихся при фиксированном режиме освещения, не выявлено признаков вакуолизации и дистрофических изменений в гепатоцитах.

У крыс, которых содержали в условиях темновой депривации (рис. 2), в гепатоцитах наблюдается выраженный отёк цитоплазмы, деформация клеточных ядер (рис. 2, *a*), полиморфизм митохондрий, явления «осыпания» рибосом с поверхности шероховатой эндоплазматической сети, а также наличие вакуолей (рис. 2, *b*).

С помощью электронной микроскопии в гепатоцитах животных III группы (введение CCl_4 в условиях фиксированного светового режима, рис. 3) выявлены многочисленные вакуоли, в том числе содержащие липиды, большое количество лизосом и пероксисом (рис. 3, *a*), признаки набухания митохондрий (рис. 3, *b*). Кроме того, на срезах печени крыс этой группы присутствуют некротизированные гепатоциты.

В печени животных IV группы (рис. 4), содержащихся в условиях темновой депривации с одновременным введением тетрахлорметана, существенно выражена жировая дистрофия. Происходит деформация гепатоцитов и их ядер, набухание митохондрий. В цитоплазме гепатоцитов содержатся крупные жировые вакуоли различной электронной плотности, а также большое количество лизосом и пероксисом (рис. 4, *a*). Отмечено значительное число гепатоцитов в состоянии некроза, а также разрастание коллагеновых волокон (рис. 4, *b*).

Гепатоциты крыс, которым на фоне сочетанного воздействия темновой депривации и тетрахлорметана вводили мелатонин, характеризуются округлым центрально расположенным ядром, небольшим количеством вакуолей, в том числе содержащих липиды, признаками набухания митохондрий, с просветлением матрикса и деструкцией крист, а также значительным содержанием пероксисом в цитоплазме (рис. 5). Обнаруженные ультраструктурные изменения отражают активацию реакций адаптации к воздействию повреждающих факторов.

Темновая депривация вызывает статистически значимое уменьшение микроморфометрических показателей митохондрий в гепатоцитах. У крыс III и IV групп увеличивается площадь митохондрий на фоне уменьшения их количества, а также значительно увеличиваются размеры и длина крист. При этом количество крист в митохондриях уменьшается в гепатоцитах крыс III группы, но увеличивается у животных из группы IV. Значения KBMM ниже контрольного уровня у животных обеих групп. В гепатоцитах крыс V группы статистически значимо уменьшаются длина крист и KBMM (табл. 1)

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённое исследование выявило значительное влияние темновой депривации и токсического действия тетрахлорметана на ультраструктуру гепатоцитов, а также продемонстрировало протекторный эффект экзогенного мелатонина при сочетанном воздействии этих двух факторов.

Темновая депривация (II группа) вызывает выраженные изменения в гепатоцитах, включая отёк цитоплазмы, деформацию ядер, полиморфизм митохондрий и «осыпание» рибосом с поверхности гранулярной эндоплазматической сети. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, демонстрирующих, что подавление синтеза мелатонина при нарушении циркадных ритмов влечёт за собой дисфункцию антиоксидантной системы и развитие окислительного стресса [2, 3, 36, 37].

Микроморфометрический анализ показал статистически значимое снижение количества митохондрий, уменьшение их суммарной площади, длины крист и концентрации внутренних мембран. Эти изменения свидетельствуют о нарушении энергетического метаболизма в клетках в условиях темновой депривации, что может быть связано с угнетением активности митохондриальных ферментов на фоне дефицита мелатонина [14, 15].

Введение CCl_4 (III группа) вызывает более тяжёлые повреждения гепатоцитов, чем темновая депривация, включая вакуолизацию цитоплазмы, набухание митохондрий, накопление липидов и развитие некроза. Такие морфологические изменения соответствуют классической модели гепатотоксичности CCl_4 , при которой его метаболиты (трихлорметил-радикалы) индуцируют перекисное окисление липидов, повреждение мембран и апоптоз [6, 9, 38].

В условиях темновой депривации (IV группа) токсический эффект CCl_4 усугубляется: отмечено увеличение площади митохондрий при одновременном снижении их количества, что, вероятно, отражает компенсаторное увеличение объема органелл в ответ на повреждение. Однако уменьшение длины крист и КВММ свидетельствует о нарушении процессов окислительного фосфорилирования. Описанные изменения согласуются с литературными данными о существенной роли мелатонина в поддержании митохондриальной функции [26, 29].

Введение мелатонина (V группа) на фоне токсического повреждения и темновой депривации значительно снижает выраженность структурных изменений в гепатоцитах. У крыс этой группы отмечены неизменённая форма ядер и уменьшение количества липидных вакуолей, что подтверждает антиоксидантные и антифибротические свойства мелатонина, описанные в литературе [17, 20]. В то же время сохраняются вызванные CCl_4 изменения ультраструктуры митохондрий. При этом значения некоторых микроморфометрических показателей митохондрий в V группе не отличались от контроля, что указывает на тенденцию к нормализации энергетического обмена под действие экзогенного мелатонина. Одним из возможных механизмов такого эффекта мелатонина может быть подавление перекисного окисления липидов и активация синтеза глутатиона [27, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Темновая депривация вызывает структурно-функциональные нарушения в гепатоцитах, включая повреждение митохондрий и развитие окислительного стресса. Токсическое действие CCl_4 усугубляется на фоне дефицита мелатонина, что проявляется усилением жировой дистрофии, некроза и фиброзных изменений в печени. Экзогенный мелатонин демонстрирует выраженное гепатопротекторное действие, способствуя нормализации ультраструктуры гепатоцитов и митохондриальных функций. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения мелатонина в комплексной терапии токсических поражений печени, особенно при нарушенных циркадных ритмах.

Несмотря на продемонстрированное гепатопротекторное действие мелатонина, некоторые аспекты требуют дальнейшего изучения. В частности, необходимо уточнить молекулярные механизмы взаимодействия мелатонина с «часовыми» генами гепатоцитов (например, *Bmal1* и *Clock*), а также его участие в регуляции сигнальных путей, связанных с фиброзом (TGF- β , NF- κ B и др.).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Д.А. Арешидзе, С.А. Грабеклис, Л.М. Михалева, А.М. Дыгай — определение концепции, анализ данных, написание рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; М.А. Козлова, В.П. Черников — проведение исследования. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Работу с животными проводили в соответствии с требованиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных», и приказом Минздрава России № 267 от 19 июня 2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование одобрено биоэтическим комитетом ФГБНУ «НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына», протокол № 34(10) от 14 марта 2022 г.

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского № 122030200535-1.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

ADDITIONAL INFO

Author contributions: The main contribution is distributed as follows: D.A. Areshidze, S.A. Grabeklis, L.M. Mikhaleva, A.M. Dygai — conception of the work, analysis of literary data, interpretation of results, writing and editing of the article text; M.A. Kozlova, V.P. Chernikov — animal manipulations, histological studies. All authors have approved the manuscript (the version to be published) and have

agreed to be accountable for all aspects of the work to ensure that issues relating to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: Work with animals was conducted in accordance with the requirements of the “International Guidelines for Conducting Biomedical Research on Animals” and the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation (19 June 2003, N 267) “On Approval of the Rules of Laboratory Practice”. The study was approved by the Bioethics Committee of the Research Institute of Human Morphology named after Academician A.P. Avtsyn (protocol N 34(10), 14 March 2022).

Funding sources: The study was carried out within the framework of the state assignment of the Research Institute of Human Morphology named after Academician A.P. Avtsyn of Petrovsky National Research Centre of Surger N 122030200535-1.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Areshidze DA, Kozlova MA, Chernikov VP, Kondashevskaya MV. The influence of the constant illumination on the ultrastructure of rat's hepatocytes. *Morphological Newsletter*. 2023;31(1):46–53. (In Russ.) doi: 10.20340/mv-mn.2023.31(1).758 EDN: ZGVUHK
2. Fárková E, Schneider J, Šmótek M, et al. Weight loss in conservative treatment of obesity in women is associated with physical activity and circadian phenotype: a longitudinal observational study. *Biopsychosoc Med*. 2019;13:24. doi: 10.1186/s13030-019-0163-2 EDN: DSJXIU
3. Anisimov VN. Light desynchronization and health. *Light & Engineering*. 2019;(1):30–38. (In Russ.) EDN: YXUWLZ
4. Trufakin VA, Shurlygina AV, Michurina SV. Lymphoid system – circadian temporary organization and desynchronization. *Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012;32(1):5–12. (In Russ.) EDN: OPUFHD
5. Zlobina OV, Pakhomov SS, Bugaeva IO, et al. The morphological changes of liver in laboratory animals at the light-induced desynchronization. *Journal of New Medical Technologies, eEdition*. 2018;12(5):245–249. (In Russ.) EDN: YMZZPF
6. McGill MR, Jaeschke H. Animal models of drug-induced liver injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(5):1031–1039. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.08.037
7. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*. 2003;33(2):105–136. doi: 10.1080/713611034
8. Clemens MM, McGill MR, Apte U. Mechanisms and biomarkers of liver regeneration after drug-induced liver injury. *Adv Pharmacol*. 2019;85:241–262. doi: 10.1016/bs.apha.2019.03.001
9. Li X, Wang L, Chen C. Effects of exogenous thymosin β_4 on carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5872. doi: 10.1038/s41598-017-06318-5 EDN: EOXVUQ
10. Xu P, Yao J, Ji J, et al. Deficiency of apoptosisstimulating protein 2 of p53 protects mice from acute hepatic injury induced by CCl₄ via autophagy. *Toxicol Lett*. 2019;316:85–93. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.09.006
11. Boll M, Weber LW, Becker E, Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2001;56(7-8):649–659. doi: 10.1515/znc-2001-7-826
12. Taira Z, Ueda Y, Monmasu H, et al. Characteristics of intracellular Ca²⁺ signals consisting of two successive peaks in hepatocytes during liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats. *J Exp Pharmacol*. 2016;8:21–33. doi: 10.2147/JEP.S106084 EDN: XZHMHF
13. Cao R, Cao C, Hu X, et al. Kaempferol attenuates carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis by promoting ASIC1a degradation and suppression of the ASIC1a-mediated ERS. *Phytomedicine*. 2023;121:155125. doi: 10.1016/j.phymed.2023.155125 EDN: MVDPYM
14. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1472(1-2):206–214. doi: 10.1016/s0304-4165(99)00125-7 EDN: ADVNON
15. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(16):2997–3025. doi: 10.1007/s00018-014-1579-2 EDN: UVWSGR
16. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res*. 2014;57(2):131–146. doi: 10.1111/jpi.12162 EDN: URPJML
17. Pan M, Song YL, Xu JM, Gan HZ. Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res*. 2006;41(1):79–84. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00346.x
18. Hatzis G, Ziakas P, Kavantzias N, et al. Melatonin attenuates high fat diet-induced fatty liver disease in rats. *World J Hepatol*. 2013;5(4):160–169. doi: 10.4254/wjh.v5.i4.160
19. Tsai CC, Lin YJ, Yu HR, et al. Melatonin alleviates liver steatosis induced by prenatal dexamethasone exposure and postnatal high-fat diet. *Exp Ther Med*. 2018;16(2):917–924. doi: 10.3892/etm.2018.6256
20. Fernández A, Ordóñez R, Reiter RJ, et al. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis.

- J Pineal Res.* 2015;59(3):292–307. doi: 10.1111/jpi.12264
21. Liu H, Zheng Y, Kan S, et al. Melatonin inhibits tongue squamous cell carcinoma: Interplay of ER stress-induced apoptosis and autophagy with cell migration. *Heliyon.* 2024;10(8):e29291. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e29291 EDN: [WLLYJX](#)
 22. Bona S, Rodrigues G, Moreira AJ, et al. Antifibrogenic effect of melatonin in rats with experimental liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *JGH Open.* 2018;2(4):117–123. doi: 10.1002/jgh3.12055
 23. Colares JR, Hartmann RM, Schemitt EG, et al. Melatonin prevents oxidative stress, inflammatory activity, and DNA damage in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol.* 2022;28(3):348–364. doi: 10.3748/wjg.v28.i3.348 EDN: [GOPHIU](#)
 24. Fernández-Palanca P, Méndez-Blanco C, Fondevila F, et al. Melatonin as an antitumor agent against liver cancer: An updated systematic review. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(1):103. doi:10.3390/antiox10010103 EDN: [MTKHAD](#)
 25. Mortezaee K. Human hepatocellular carcinoma: Protection by melatonin. *J Cell Physiol.* 2018;233(10):6486–6508. doi: 10.1002/jcp.26586 EDN: [YIPHTF](#)
 26. Wang H, Wei W, Wang NP, et al. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci.* 2005;77(15):1902–1915. doi: 10.1016/j.lfs.2005.04.013
 27. Noyan T, Kömüroğlu U, Bayram I, Sekeroğlu MR. Comparison of the effects of melatonin and pentoxifylline on carbon tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Cell Biol Toxicol.* 2006;22(6):381–391. doi: 10.1007/s10565-006-0019-y EDN: [YADRV T](#)
 28. Aranda M, Albendea CD, Lostalé F, et al. In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline. *J Pineal Res.* 2010;49(1):78–85. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00769.x
 29. Mortezaee K, Khanlarkhani N. Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: A review. *J Cell Physiol.* 2018;233(5):4015–4032. doi: 10.1002/jcp.26209 EDN: [YEDMAP](#)
 30. Jie L, Hong RT, Zhang YJ, et al. Melatonin alleviates liver fibrosis by inhibiting autophagy. *Curr Med Sci.* 2022;42(3):498–504. doi: 10.1007/s11596-022-2530-7 EDN: [KBWZLN](#)
 31. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol.* 2009;15(12):1452–1458. doi: 10.3748/wjg.15.1452 EDN: [MGYKHZ](#)
 32. Devaraj E, Roy A, Royapuram Veeraragavan G, et al. β -Sitosterol attenuates carbon tetrachloride-induced oxidative stress and chronic liver injury in rats. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2020;393(6):1067–1075. doi: 10.1007/s00210-020-01810-8 EDN: [NRUJBQ](#)
 33. Balkanov AS, Rozanov ID, Golanov AV, et al. Endothelium changes of peritumoral zone capillaries after brain glioblastoma adjuvant radiation therapy. *Clinical and Experimental Morphology.* 2021;10(1):33–40. (In Russ.) doi: 10.31088/CEM2021.10.1.33-40 EDN: [KOUJY](#)
 34. Kurbat MN, Kravchuk RI, Astrowskaja AB. Effect of melatonin on the morphology of mitochondria and other cellular components of the hepatocyte. *Hepatology and Gastroenterology.* 2018;2(2):138–142. (In Russ.) EDN: TTCMUQ
 35. Bezborodkina NN, Okovity SV, Kudryavtseva MV, et al. Morphometry of hepatocyte mitochondrial apparatus in normal and cirrhotic rat liver. *Cytology.* 2008;50(3):228–235. (In Russ.) EDN: ILHEHH
 36. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res.* 2016;61(3):253–278. doi: 10.1111/jpi.12360 EDN: [VJOHGY](#)
 37. Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br J Pharmacol.* 2018;175(16):3190–3199. doi: 10.1111/bph.14116
 38. Tan DX, Manchester LC, Qin L, Reiter RJ. Melatonin: A mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):2124. doi: 10.3390/ijms17122124 EDN: [XZPHQN](#)

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

AUTHORS' INFO

Автор, ответственный за переписку:	
*Грабеклис Севи́ль Альбертовна; адрес: Россия, 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3; ORCID: 0009-0002-3290-3768; eLibrary SPIN: 4259-7674 e-mail: grabeklene@gmail.com	*Sevil A. Grabeklis; address: 3 Tsyurupy st, 117418, Moscow, Russia; ORCID: 0009-0002-3290-3768; eLibrary SPIN: 4259-7674 e-mail: grabeklene@gmail.com
Соавторы:	

Михалева Людмила Михайловна , д-р мед. наук, профессор; ORCID: 0000-0003-2052-914X; eLibrary SPIN: 2086-7513; e-mail: mikhalevalm@yandex.ru	Lyudmila M. Mikhaleva , Dr. Sci. (Medicine), Professor; ORCID: 0000-0003-2052-914X; eLibrary SPIN: 2086-7513; e-mail: mikhalevalm@yandex.ru
Дыгай Александр Михайлович , д-р мед. наук, профессор, академик РАН; ORCID: 0000-0001-6286-5315; eLibrary SPIN: 8070-3578; e-mail: ombn.ramn@mail.ru	Alexandr M. Dygai , Dr. Sci. (Medicine) Professor, academician of the Russian Academy of Sciences; ORCID: 0000-0001-6286-5315; eLibrary SPIN: 8070-3578; e-mail: ombn.ramn@mail.ru
Козлова Мария Александровна , канд. биол. наук; ORCID: 0000-0001-6251-2560; eLibrary SPIN: 5647-1372; e-mail: ma.kozlova2021@outlook.com	Maria A. Kozlova , Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0001-6251-2560; eLibrary SPIN: 5647-1372; e-mail: ma.kozlova2021@outlook.com
Черников Валерий Петрович , канд. мед. наук; ORCID: 0000-0002-3253-6729; eLibrary SPIN: 3125-7837; e-mail: 1200555@mail.ru	Valery P. Chernikov , Cand. Sci. (Medicine); ORCID: 0000-0002-3253-6729; eLibrary SPIN: 3125-7837; e-mail: 1200555@mail.ru
Арешидзе Давид Александрович , канд. биол. наук; ORCID: 0000-0003-3006-6281; eLibrary SPIN: 4348-6781; e-mail: labcelpat@mail.ru	David A. Areshidze , Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0003-3006-6281; eLibrary SPIN: 4348-6781; e-mail: labcelpat@mail.ru

РИСУНКИ

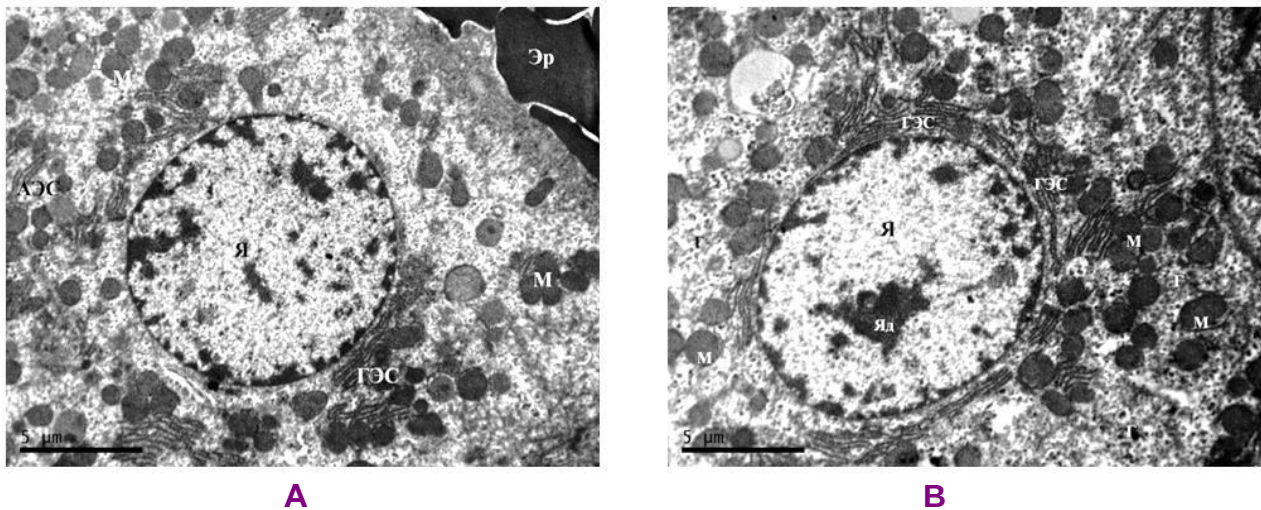


Рис. 1. Ультраструктура гепатоцитов у крыс контрольной (I) группы: Г—гликоген, ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть, АЭС — агранулярная эндоплазматическая сеть, М — митохондрия, Эр — эритроцит, Я — ядро, Яд — ядрышко. Трансмиссионная электронная микроскопия, увеличение $\times 8000$, масштабный отрезок 5 мкм.

Fig. 1. Ultrastructure of hepatocytes in animals of the control group. TEM, $\times 8000$. Г – glycogen; ГЭС – granular endoplasmic reticulum; АЭС - agranular endoplasmic reticulum; М – mitochondria; Эр – erythrocyte; Я – nucleus; Яд – nucleolus.

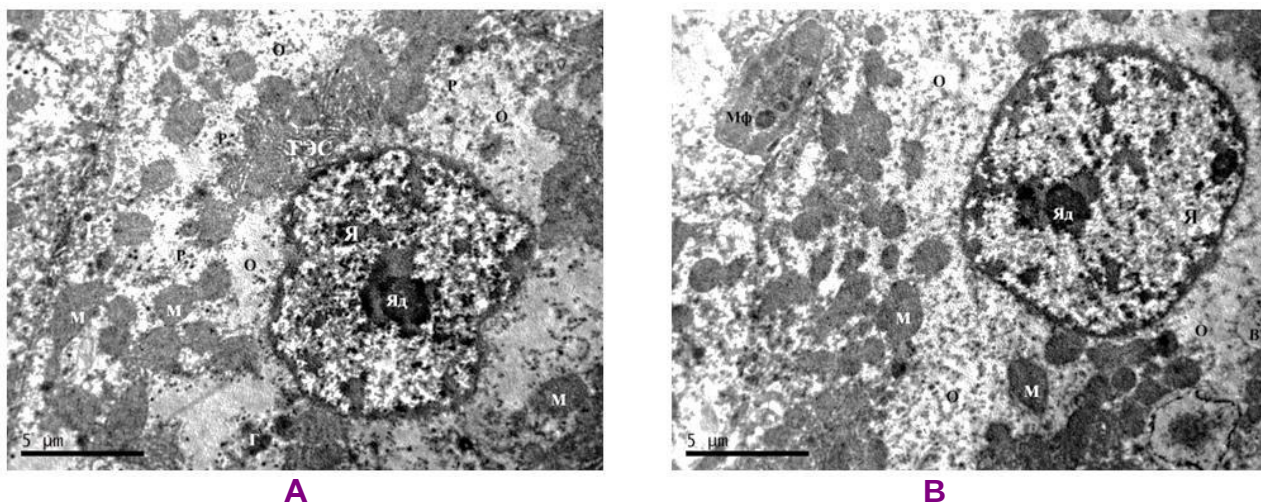
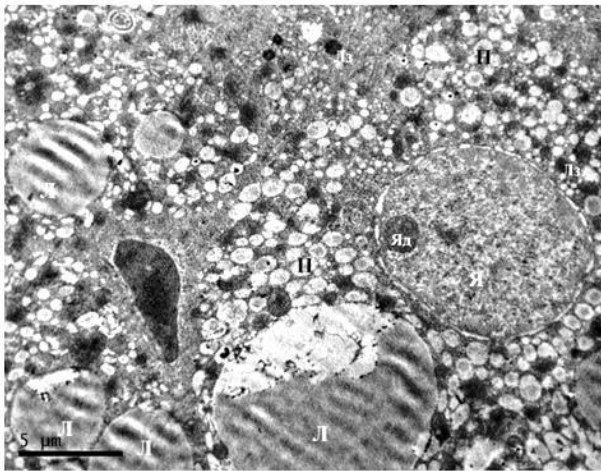
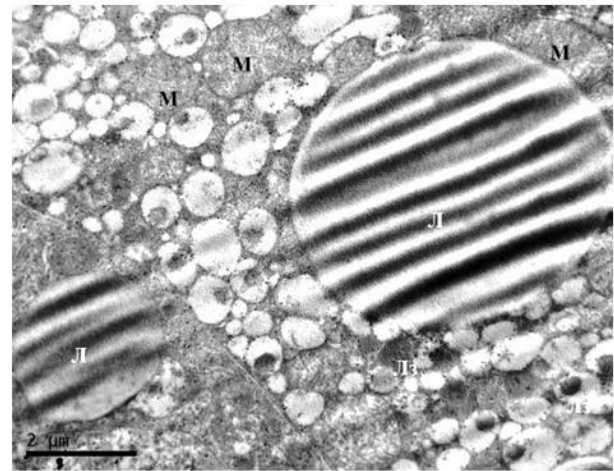


Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитов у крыс, содержащихся в условиях темновой депривации (II группа): В — вакуоль, Г — гликоген, ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть, М — митохондрия, Мф — макрофаг, О — отёк цитоплазмы, Р — рибосомы, Я — ядро, Яд — ядрышко. Трансмиссионная электронная микроскопия, увеличение $\times 8000$, масштабный отрезок 5 мкм.

Fig. 2. Ultrastructure of hepatocytes in animals of the I experimental group. TEM, $\times 8000$. В – vacuole; Г – glycogen; ГЭС – granular endoplasmic reticulum; М – mitochondria; Мф - macrophage; О - cytoplasmic edema; Р – ribosomes; Я – nucleus; Яд – nucleolus.



А



В

Рис. 3. Ультраструктура гепатоцитов у крыс с токсическим повреждением печени в условиях фиксированного светового режима (III группа): Л — липиды, Лз — лизосома, М — митохондрия, П — пероксисомы, Я — ядро, Яд — ядрышко. Трансмиссионная электронная микроскопия, увеличение а — $\times 6700$, б — $\times 14000$, масштабный отрезок а — 5 мкм, б — 2 мкм.

Fig. 3. Ultrastructure of hepatocytes in animals of the II experimental group. TEM, А — $\times 6700$, Б — $\times 14000$. Л — lipids; Лз — lysosome; М — mitochondria; П — peroxisome; Я — nucleus; Яд — nucleolus.

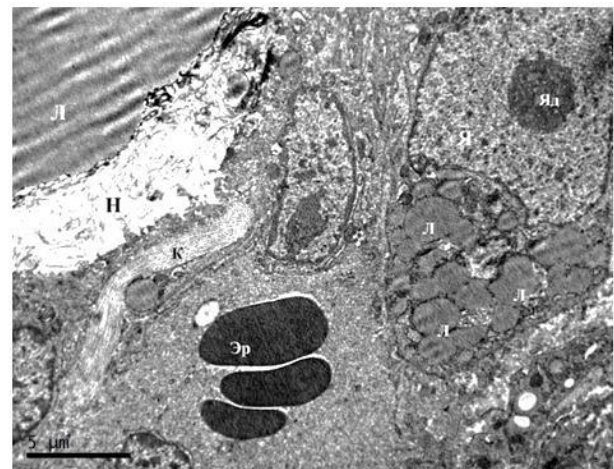
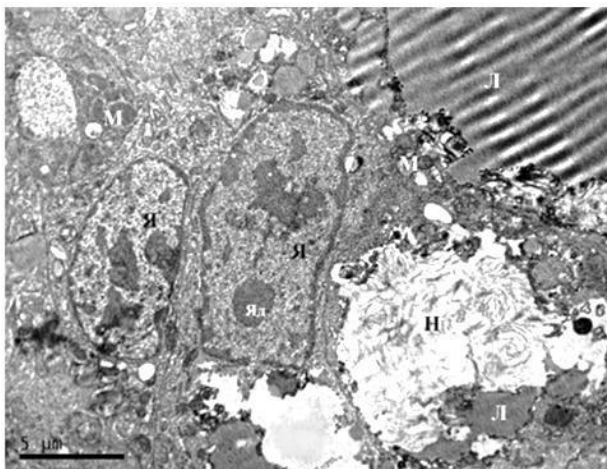


Рис. 4. Ультраструктура гепатоцитов у крыс с токсическим повреждением печени на фоне темновой депривации (IV группа): К — коллагеновые волокна, Л — липиды, М — митохондрия, Н — очаг микронекроза, Эр — эритроцит, Я — ядро, Яд — ядрышко. Трансмиссионная электронная микроскопия, увеличение $\times 6700$, масштабный отрезок 5 мкм.

Fig. 4. Ultrastructure of hepatocytes in animals of the III experimental group. TEM, $\times 6700$.; К - collagen fibers; Л — lipids; М — mitochondria; Н - the focus of micronecrosis; Эр — erythrocyte; Я — nucleus; Яд — nucleolus.

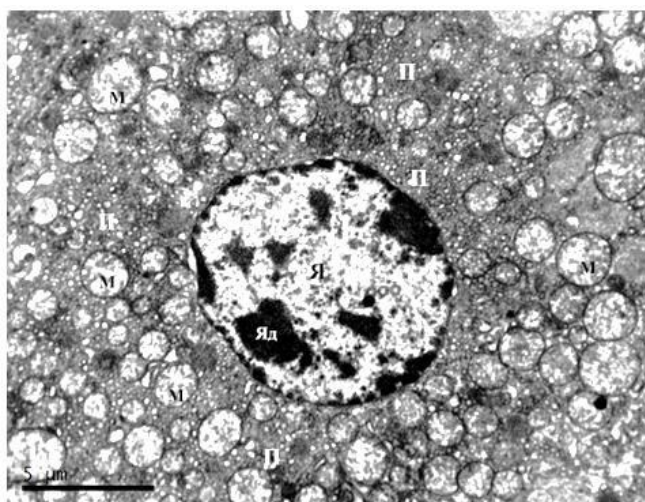


Рис. 5. Ультраструктура гепатоцитов у крыс, которым вводили мелатонин на фоне токсического повреждения печени в сочетании с темновой депривацией (V группа): М — митохондрия, П — пероксисомы, Я — ядро, Яд — ядрышко. Трансмиссионная электронная микроскопия, увеличение $\times 8000$, масштабный отрезок 5 мкм.

Fig. 5. Ultrastructure of hepatocytes in animals of the IV experimental group. TEM, $\times 8000$. М – mitochondria; П – peroxisome; Я – nucleus; Яд – nucleolus.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Результаты раздельного и совместного воздействия темновой депривации, тетрахлорметана и экзогенного мелатонина на микроморфометрические показатели митохондрий гепатоцитов у крыс

Table 1. The effect of the separate and combined action of dark deprivation and CCl₄, as well as exogenous melatonin on some micromorphometric parameters of rat hepatocyte mitochondria

Группы	Суммарная площадь сечения митохондрий, мкм ²	Количество митохондрий, шт.	Площадь сечения одной митохондрии, мкм ²	Периметр одной митохондрии, мкм
I группа — контроль, $n=40$	26,64 $\pm$ 4,15	90,82 $\pm$ 6,0	0,29 $\pm$ 0,04	2,53 $\pm$ 0,12
II группа, $n=40$	21,80 $\pm$ 1,71***	78,71 $\pm$ 5,23***	0,28 $\pm$ 0,01***	2,30 $\pm$ 0,39***
III группа, $n=40$	34,26 $\pm$ 3,40***	51,11 $\pm$ 4,55***	0,66 $\pm$ 0,04***	2,98 $\pm$ 0,40***
IV группа, $n=40$	37,15 $\pm$ 4,81***	51,31 $\pm$ 4,88***	0,72 $\pm$ 0,05***	3,11 $\pm$ 0,31***
V группа, $n=40$	25,11 $\pm$ 7,11	88,11 $\pm$ 10,22	0,28 $\pm$ 0,06	2,22 $\pm$ 0,25

Группа	Суммарная длина крист в одной митохондрии, мкм	Количество крист в одной митохондрии, мкм	Длина одной кристы, мкм	Концентрация внутренних мембран митохондрий, мкм ⁻¹
I группа — контроль, $n=40$	1,07 $\pm$ 0,01	6,41 $\pm$ 0,41	0,167 $\pm$ 0,008	26,00 $\pm$ 3,01
II группа, $n=40$	0,91 $\pm$ 0,04***	5,61 $\pm$ 0,38***	0,160 $\pm$ 0,010***	20,44 $\pm$ 2,15***
III группа, $n=40$	1,03 $\pm$ 0,05***	5,80 $\pm$ 0,51***	0,177 $\pm$ 0,011***	17,00 $\pm$ 1,88***
IV группа, $n=40$	0,76 $\pm$ 0,06***	6,91 $\pm$ 0,59***	0,110 $\pm$ 0,013***	16,98 $\pm$ 1,95***

Морфология / Morphology
Оригинальные исследования / Original Study Articles
DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.678840>

V группа, $n=40$

$0,94 \pm 0,06^*$

$6,50 \pm 0,36$

$0,150 \pm 0,010^*$

$22,18 \pm 2,09^*$

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — стандартное отклонение. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$ по сравнению с контрольной группой.